

UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE MEDICINA
Escuela de Tecnología Médica



TESIS PROFESIONAL

Para optar al título profesional de Tecnólogo Médico con mención

“Estudio bioinformático sobre la evolución de la piocina S14 de Pseudomonas sp. I1 dentro del subgrupo Pseudomonas koreensis”

Alumno: Diego Alonzo Correa Zenteno

Tutor: Victor Antonio García

Firma:

Una firma manuscrita en azul que parece ser la del alumno, Diego Alonzo Correa Zenteno.

Una firma manuscrita en azul que dice "Victor A. García A.", correspondiente al tutor.

Fecha: 05/08/2022

ACTA CURSO TRABAJO DE INVESTIGACIÓN

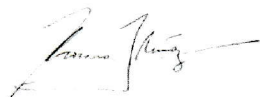
El **Sr. Diego Alonso Correa Zenteno**, estudiante de Tecnología Médica con Mención en Bioanálisis Clínico Molecular, Hematología y Medicina Transfusional, cumpliendo con los requisitos establecidos en el plan de estudio, realizó durante el noveno semestre de la carrera, la Tesis Profesional titulada: **“Estudio bioinformático sobre la evolución de la pirocina S14 de *Pseudomonas sp. 11* dentro del subgrupo *Pseudomonas koreensis*”**, dirigida por el **Prof. Victor Antonio Garcia** académico del Programa de Microbiología y Micología, Instituto de Ciencias Biomédicas, Facultad de Medicina de la Universidad de Chile.

La Escuela de Tecnología Médica designó para su corrección una Comisión integrada por la: **Profa. Cecilia Toro** y el **Prof. Eduardo Álvarez**, ambos académicos del Programa Microbiología y Micología, Instituto de Ciencias Biomédicas, Facultad de Medicina de la Universidad de Chile

La calificación obtenida se detalla a continuación:

Corrector 1 Cecilia Toro	6.43	25%
Corrector 2 Eduardo Álvarez	6.75	25%
Tutor(es) Guía:		
Evaluación intermedia	6.60	25%
Nota final tutor	7.00	25%
Nota final tesis profesional	6.70	

En consecuencia el estudiante **Diego Alonso Correa Zenteno** aprueba satisfactoriamente la asignatura.



Profa. Rosana Muñoz Videla
Coordinador(a) curso
Trabajo de Investigación



Prof. Hernán Torres
PEC curso
Trabajo de Investigación

UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE MEDICINA
Escuela de Tecnología Médica



TESIS PROFESIONAL

Para optar al título profesional de Tecnólogo Médico con mención

“Estudio bioinformático sobre la evolución de la piocina S14 de Pseudomonas sp. I1 dentro del subgrupo Pseudomonas koreensis”

Alumno: Diego Alonzo Correa Zenteno

Tutor: Victor Antonio García

Firma:

Una firma manuscrita en azul que parece ser la del alumno, Diego Alonzo Correa Zenteno.

Una firma manuscrita en azul que dice "Victor A. García A.", correspondiente al tutor.

Fecha: 05/08/2022

UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE MEDICINA
Escuela de Tecnología Médica



TESIS PROFESIONAL

Para optar al título profesional de Tecnólogo Médico con mención

“Estudio bioinformático sobre la evolución de la plocina S14 de Pseudomonas sp. I1 dentro del subgrupo Pseudomonas koreensis”

Alumno: Diego Alonzo Correa Zenteno

Tutor: Víctor Antonio García

Firma:

Una firma manuscrita en azul que parece ser la del alumno, Diego Alonzo Correa Zenteno.

Una firma manuscrita en azul que dice "Víctor A. García A.", correspondiente al tutor.

Fecha: 05/08/2022

ÍNDICE

1. Resumen	4
2. Introducción	3
3. Objetivos	14
4. Metodologías	14
5. Resultados	19
6. Discusión	27
7. Conclusión	30
8. Referencias bibliográficas.....	31

1. RESUMEN

El incremento de la resistencia contra los antibióticos por parte de bacterias patógenas como *Pseudomonas aeruginosa* es un problema actual para el cual se deben buscar estrategias alternativas al uso de antibióticos convencionales. Una de las alternativas es el uso de antimicrobianos como las bacteriocinas, las bacteriocinas son proteínas con actividad antimicrobiana específica, estas son sintetizadas por bacterias como mecanismo de competencia contra otras bacterias filogenéticamente cercanas. Un tipo de bacteriocina son las piocinas, estas son sintetizadas por bacterias del género *Pseudomonas*. Se ha demostrado la capacidad antimicrobiana de diferentes piocinas y conocer los mecanismos tras su rápida adaptación y evolución es un paso importante que se debe dar para la creación de estrategias para el control de enfermedades causadas por bacterias patógenas como *P. aeruginosa*. Hasta la fecha no hay estudios detallados que aborden los mecanismos moleculares de la especificidad y la evolución de estas piocinas. Esta investigación apunta a identificar el mecanismo de evolución de una piocina nueva con presunta actividad DNAsa denominada piocina S14 previamente identificada mediante minería genómica en el genoma de un aislado de *Pseudomonas* capaz de inhibir el crecimiento de *P. aeruginosa* PAO1. Con esto se espera aportar al posterior desarrollo de nuevas estrategias para el control de bacterias patógenas. Para esta investigación se realizó un análisis evolutivo bioinformático del genoma de diferentes cepas del subgrupo *Pseudomonas koreensis* y de las bacteriocinas encontradas en su genoma, esto mediante la reconstrucción filogenética de muestras del subgrupo *P. koreensis* y la Identificación y comparación filogenética y de motivos funcionales de ortólogos de la piocina S14 presentes en los genomas de las cepas del subgrupo *P. koreensis*. La investigación permitió identificar la organización filogenética de las cepas en estudio y sus piocinas, además de las principales zonas variables dentro de la secuencia de las proteínas. Permitiendo así identificar el mecanismo de evolución de

estas piocinas como el desarrollo evolutivo de un ancestro común en las piocinas ortólogas de la piocina S14, similar al mecanismo de las colicinas con actividad DNAsa.

2. INTRODUCCIÓN

2.1. Antimicrobianos

Desde su descubrimiento los antimicrobianos han sido un impulsor de avances en salud, agricultura y ganadería. El uso de antibióticos ha sido un factor especialmente importante para el desarrollo de la humanidad, siendo cruciales para la salud pública. Los antibióticos han elevado la esperanza de vida de las poblaciones humanas y disminuido la mortalidad asociada a enfermedades infecciosas causadas por bacterias (1).

2.2. Resistencia contra antimicrobianos

Desde el fin de la época dorada de los antibióticos, la cual comprende el tiempo entre la década de los treinta y la década de los sesenta del siglo pasado, no se ha podido mantener el ritmo al desarrollo de resistencia por parte de las bacterias. Los microorganismos patógenos se ven naturalmente enfrentados a un proceso de selección en el que presentar características que permitan eludir el efecto de los antimicrobianos resulta en una ventaja frente al resto de bacterias. Paulatinamente la presencia de estos mecanismos se ha vuelto cada vez más frecuente, dando pie a la crisis de la resistencia antimicrobiana. La resistencia a los antibióticos es una crisis de salud pública de escala mundial que amenaza la capacidad de controlar y tratar exitosamente infecciones bacterianas (1). Las enfermedades farmacorresistentes ya causan al menos 700.000 muertes al año en todo el mundo y si no se toman medidas la cifra podría aumentar a 10 millones de muertes al año para 2050 (2). En muchas especies bacterianas como *Mycobacterium tuberculosis*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Enterococcus faecium*, *Streptococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella* spp. y *Shigella* spp. han sido encontrados aislados resistentes a la mayoría de los antibióticos (3).

Debido a lo anterior es necesario trabajar en diferentes estrategias para hacer frente a esta problemática de la multirresistencia. Las moléculas antimicrobianas diferentes a los antibióticos como las bacteriocinas se presentan como una oportunidad para diseñar estrategias dirigidas al control de enfermedades infecciosas producidas por bacterias. Actualmente las bacteriocinas son utilizadas en la industria alimentaria a modo de preservantes, ejemplo de esto son las bacteriocinas de bacterias productoras de ácido láctico utilizadas durante la fermentación de productos lácteos para inhibir el crecimiento de otras bacterias gram positivas (15). Sin embargo, se han realizado estudios recientes que evidencian el potencial uso de las bacteriocinas en el tratamiento de infecciones. Por ejemplo, la piocina S5 y la AP41 son dos bacteriocinas producidas por bacterias del género *Pseudomonas* que han sido probadas exitosamente en modelos animales como estrategia para el control de sepsis producida por *P. aeruginosa* (25).

2.3. Bacteriocinas

Las bacteriocinas son moléculas de origen ribosomal de naturaleza proteica o peptídica con actividad antimicrobiana producidas por casi todas las especies bacterianas descritas hasta la fecha como adaptación a la competencia en un medio. La actividad antimicrobiana de estas moléculas suele estar dirigida a otras cepas de la misma especie, pero algunas bacteriocinas pueden presentar actividad antimicrobiana específica contra a otras especies similares a la bacteria productora, presentando un espectro de acción relativamente estrecho (20). La actividad antimicrobiana de estas proteínas se basa principalmente en dos mecanismos, uno es comprometer la integridad de las membranas celulares y el otro es presentar actividad DNAsa y RNAsa (13,14)

2.3.1. Clasificación de las bacteriocinas

2.3.1.1. Bacteriocinas de clase I

Las bacteriocinas se dividen en tres clases. Las bacteriocinas de clase I son producidas por bacterias gram positivas y corresponden a bacteriocinas de tamaño pequeño modificadas postranscripcionalmente por deshidratación y ciclación de residuos de aminoácidos. Comúnmente presentan aminoácidos inusuales, como aminoácidos deshidratados, lantionina y 3-metil-lantionina. Forman estructuras en anillo, lo que les confiere estabilidad estructural frente a cambios en la temperatura, pH y frente a proteólisis. Suelen asociarse con la inhibición de bacterias gram positivas y patógenos transmitidos por los alimentos (17).

2.3.1.2. Bacteriocinas de clase II

Las bacteriocinas de clase II son producidas por bacterias gram positivas, son de tamaño pequeño, termoestables, no contienen aminoácidos inusuales y sólo en algunos ejemplos hay modificaciones postraduccionales como la formación de puentes disulfuro. Comúnmente están dirigidas a desestabilizar, permeabilizar o inducir la formación de poros en membranas bacterianas (17).

2.3.1.3. Bacteriocinas de clase III

Las bacteriocinas de clase III son proteínas termolábiles comparativamente más grandes que las de clase I y II. Este grupo a su vez se ha clasificado en colicinas, microcinas, bacteriocinas de tipo cola de fago y bacteriocinas similares a las colicinas. Este último grupo también se ha clasificado según la bacteria que sintetice la bacteriocina, las bacteriocinas de clase III producidas por especies del género *Pseudomonas* son denominadas piocinas (17).

2.4. Piocinas

Las piocinas se clasifican en piocinas de tipo R, F y S. Las piocinas de tipo S son proteínas compuestas por módulos funcionales, poseen un dominio cercano al N-terminal de unión a receptor, un dominio central llamado dominio de translocación y finalmente un dominio C-terminal con actividad citotóxica (18). Las piocinas tipo S poseen actividad específica contra especies relacionadas filogenéticamente con la especie productora, y tienen como principal receptor proteínas constituyentes de la membrana bacteriana, por ejemplo, en el caso de las piocinas S2, S3, S4 y S5 sus receptores son proteínas en forma de barril conocidas como receptores de ferrisideróforos dependientes de TonB en la membrana externa o receptores de sideróforos tipo pioverdina (29). En el caso de la piocina S5 se ha descrito afinidad por el receptor de ferripioquelina FptA (30), mientras que para S6 se ha descrito que esta piocina no se dirige a un tipo específico de receptor de ferripioverdina (29).

2.5. *Pseudomonas* sp. I1.

Previamente en un estudio realizado por el equipo de investigación del laboratorio se aisló desde el Río Mapocho una cepa capaz de inhibir a múltiples bacterias en ensayos de inhibición en placa, entre ellas *S. aureus* ATCC 43300, *K. pneumoniae* BAA1705, *Vibrio cholerae* N16961, *E. coli* enterotoxigénica y *P. aeruginosa* PAO1. Posteriormente se realizó la secuenciación del genoma de este aislado y utilizando el producto de esta secuenciación se realizó una reconstrucción filogenética mediante la cual se determinó la filogenia de la cepa denominada entonces como *Pseudomonas* sp I1 (13). *Pseudomonas* sp. I1 es un bacilo gram negativo del género *Pseudomonas*. En el género *Pseudomonas* se ha conformado el complejo *Pseudomonas fluorescens*. A este complejo se han asignado taxonómicamente más de cincuenta especies diferentes relacionadas

filogenéticamente entre sí de manera cercana. Dentro de este complejo se han definido nueve subgrupos, uno de ellos es el subgrupo *Pseudomonas koreensis* (24) al cual pertenece *Pseudomonas* sp I1. Una caracterización posterior de esta cepa utilizando herramientas de minería genómica identificó en su genoma clusters que codifican para bacteriocinas, siendo una de esas bacteriocinas identificada como Carocina D por la plataforma BAGEL4(33). Esta bacteriocina se denominó piocina S14 y representa una piocina novel. La piocina S14 de *Pseudomonas* sp. I1 posee una nueva combinación de dominios, con ortólogos conservados en otras especies de *Pseudomonas*, sin embargo, no se ha caracterizado aún su funcionalidad experimentalmente (13).

2.5.1. Piocina S14.

La piocina S14 es una bacteriocina, piocina de tipo S, que presenta una combinación de dominios no observada en las piocinas de tipo S caracterizadas hasta el momento. Está constituida por un dominio DNasa que mantiene un 51% de identidad con el dominio C-terminal de la carocina D de *Pectobacterium carotovorum*, un dominio de translocación que comparte un 31% de identidad con el de las piocinas S1 y S2, un dominio helicoidal que probablemente actúa como dominio de unión a receptor el cual comparte un 31% de identidad con el dominio helicoidal de la piocina S8 y una región de 66 aminoácidos no estructurada en el extremo N-terminal que no posee identidad con secuencias anteriormente caracterizadas. La presencia de dominios cortos no estructurados en el N-terminal distal es común en las piocinas tipo S (Fig. 1 A) (13). Debido a que el dominio C-terminal de la piocina S14 comparte identidad con el dominio terminal de la carocina D y se ha reportado que el dominio terminal de la carocina D posee actividad DNasa (19), se hipotetiza que el dominio terminal de la Piocina S14 también poseería actividad DNasa. Esta nueva piocina está codificada en el genoma de *Pseudomonas* I1 en un operón que contiene los genes para la síntesis de la piocina S14 y su proteína de inmunidad (Fig. 1B) (13).

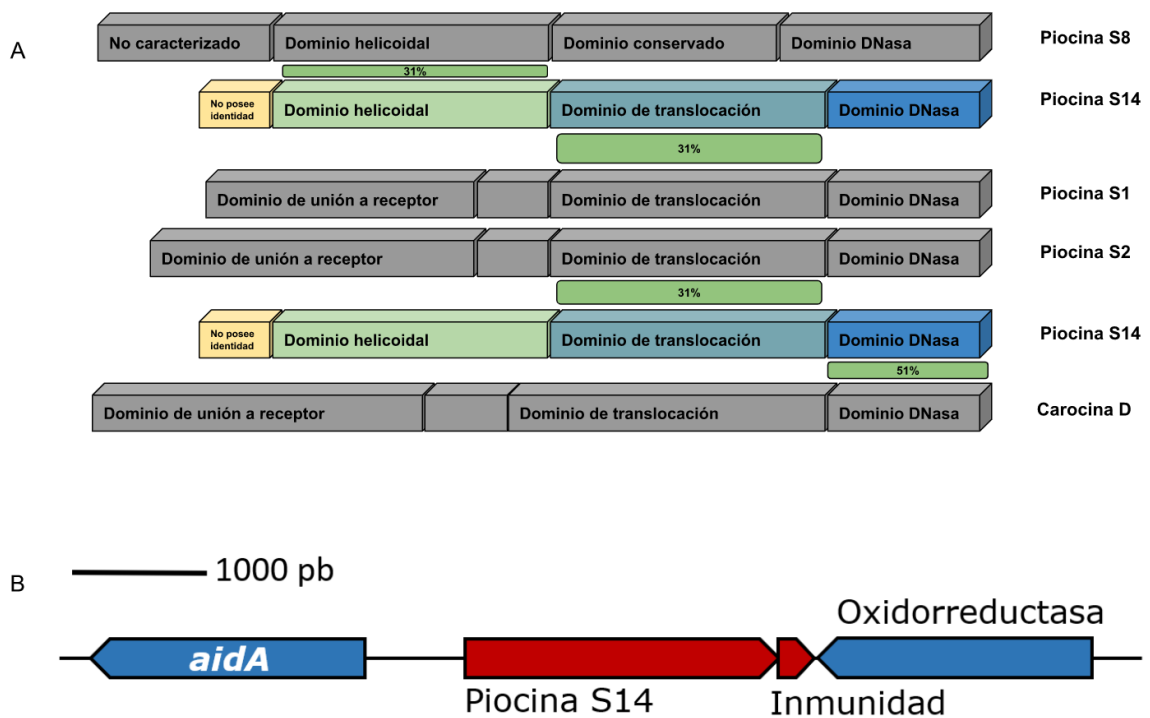


Figura 1. Organización de dominios y operón de la piocina S14. **A.** En verde se muestra el dominio helicoidal de la Piocina S14 que mantiene un 31% de identidad con el dominio helicoidal de Piocina S8, en celeste se muestra el dominio de translocación que mantiene un 31% de identidad con los dominios de translocación de las Piocinas S1 y S2, en azul se muestra el dominio DNasa que mantiene un 51% de identidad con el dominio DNasa de la carocina D. **B.** En rojo se muestra el operón conteniendo los genes para la Piocina S14 y para su proteína de inmunidad, ubicado corriente abajo del gen estructural para la Piocina S14. (13)

2.5.1.1. Piocina S14 como futura opción de tratamiento contra *P. aeruginosa*

P. aeruginosa es un agente de infección considerado oportunista (4), es un bacilo flagelado, es una bacteria facultativa, ubicua en el ambiente, encontrándose en suelos y aguas, siendo capaz de persistir en temperaturas de 20 a 43°C (5). Esta especie es una de las principales causas de infecciones nosocomiales multirresistentes, siendo responsable de entre 10 al 15 % de éstas en todo el mundo (6). En Chile es el tercer agente más común asociado a infecciones del tracto urinario, el cuarto más común en infecciones del torrente sanguíneo asociado a catéter venoso central y el agente más frecuente en neumonías asociadas a ventilación mecánica (7). *P. aeruginosa* puede

poseer diferentes mecanismos de resistencia antibiótica, entre ellos la producción de metalo-betalactamasas, betalactamasas de espectro extendido (BLEE), carbapenemasas principalmente de tipo VIM y también de tipo KPC (8). En Chile *P. aeruginosa* resistente a carbapenémicos es uno de los principales agentes en infecciones de pacientes en Unidad de Cuidados Intensivos (9). *P. aeruginosa* también pueden presentar otros mecanismos de resistencia como producción de bombas de flujo MexAB-OprM, MexXY-OprM, MexCD-OprJ y MexEF-OprN (10), disminución de la permeabilidad de la membrana a antibióticos mediada por OprB y OprD (11), modificación de blancos antimicrobianos como la ADN girasa por mutaciones en genes *gyrA* y *gyrB* y modificaciones en la ADN topoisomerasa (12). En consideración de lo antes mencionado y la gran capacidad de resistencia a los antibióticos que posee esta bacteria, toma gran relevancia la búsqueda de nuevas estrategias para el control de enfermedades infecciosas provocadas por *P. aeruginosa*. Previamente se ha descrito capacidad antimicrobiana de otras piocinas como piocina S8 contra *P. aeruginosa* PAO1. Esta piocina posee actividad citotóxica endonucleasa dependiente de metales en la bacteria diana (32). También se ha observado en modelos murinos la efectividad de las piocinas S5 y AP41 (25). Es aquí donde estudios evolutivos de las piocinas, como la piocina S14 producida por *Pseudomonas* sp. I1, bacteria capaz de inhibir el crecimiento de *P. aeruginosa* (13), junto a otros estudios que aborden la actividad antimicrobiana de esta piocina podrían brindar las bases para explotar el potencial de la variedad de piocinas tipo S en el diseño de nuevas estrategias antimicrobianas frente a *P. aeruginosa* y otros patógenos.

2.6. Estudios evolutivos de bacteriocinas

Se ha observado que las bacteriocinas como las piocinas son proteínas que evolucionan rápidamente para adaptarse a la competencia en su medio (22), esto puede deberse a la presión que ejerce la constante modificación de sus receptores en las bacterias diana, los cuales son por lo general receptores de ferritioverdinas. Estos receptores están

constantemente siendo modificados para adaptarse a la competencia por el hierro del medio ambiente, aquello modificando su afinidad por los diferentes sideróforos que captan hierro en su ambiente (31). Si bien existen diversos estudios de evolución de bacteriocinas, como lo pueden ser los estudios evolutivos que abordan las colicinas en *E. coli*, homólogas a las piocinas en *Pseudomonas* spp, no existen estudios evolutivos detallados para ninguna de las piocinas descritas hasta la fecha. La realización de estos estudios puede cobrar especial importancia para entender la diversidad de piocinas y el potencial antagónico que presentan contra cepas patógenas de *Pseudomonas* spp.

2.6.1. Estudios evolutivos de colicinas

Para las colicinas se han descrito principalmente dos mecanismos evolutivos diferentes, los cuales se distinguen también entre sí por el mecanismo involucrado en la actividad antimicrobiana de la colicina. Por una parte están las colicinas formadoras de poros de membrana, las cuales se estructuran a través de mosaicos de dominios compartidos y divergentes, estas colicinas formadoras de poro comparten uno o más dominios con alta similitud entre sus secuencias con respecto a otras colicinas formadoras de poros, lo que sugiere una recombinación frecuente de estos dominios. Por el otro lado están las colicinas con actividad nucleasa (DNAsa o RNAsa), estas comparten entre sí un ancestro común reciente, sus secuencias de ADN oscilan entre un 50 y un 97% de identidad siendo altamente similares (20).

2.6.2. Estudios evolutivos de piocinas

Los estudios evolutivos realizados sobre piocinas hasta la fecha son menos detallados en los mecanismos moleculares que los estudios evolutivos sobre otras bacteriocinas como las colicinas. Por tanto los mecanismos moleculares evolutivos de las piocinas no están descritos en detalle. Se sabe que los genes estructurales de las piocinas se encuentran en el cromosoma bacteriano, lo que las diferencia de la mayoría de las colicinas, sus genes reguladores están cercanos al gen estructural de la piocina y suelen

ser inducibles por agentes que dañan el ADN (21). En un estudio exploratorio en donde se evolucionó una cepa de laboratorio de *P. aeruginosa* PAO1 productora de piocina se ha descrito que el antagonismo de *P. aeruginosa* PAO1 sobre otras cepas de su especie evoluciona diferencialmente según la ausencia o presencia de otras cepas destinatarias en el medio que posean receptores para sus piocinas, aumentando su capacidad antagónica sobre aquellas cepas con las que se evolucionó la cepa productora de piocinas (22). En otro estudio se aislaron cepas de *P. aeruginosa* desde los desagües y fregaderos de diferentes casas, estas cepas posteriormente a ser aisladas fueron inducidas para la producción de piocinas mediante el uso de mitomicina C y se realizaron ensayos de inhibición cruzados entre las diferentes cepas aisladas. El estudio indicó que la inhibición mediada por piocinas de *P. aeruginosa* sobre otras cepas de su misma especie aumenta al realizar ensayos de inhibición con cepas aisladas desde diferentes casas en comparación con cepas aisladas desde la misma casa. También dentro del mismo estudio se examinó la relación entre la distancia genética basada en la comparación de secuencias de genes housekeeping y los patrones de inhibición entre los aislamientos, lo que indicó una relación de curva en forma de joroba (hump shaped yield curve) entre la distancia genética y la capacidad inhibitoria entre las diferentes cepas (23). Estos estudios indican una clara y rápida adaptación de la capacidad de inhibición de las cepas de *Pseudomonas* hacia las bacterias competidoras, pero no describen los mecanismos moleculares involucrados. La piocina S14 es novedosa con respecto a su composición de dominios, y por lo tanto un estudio sobre su posible origen e historia evolutiva puede arrojar conocimiento importante dentro del origen de la variedad de piocinas en el subgrupo *Pseudomonas koreensis* dentro del complejo *Pseudomonas fluorescens* al que pertenece la cepa *Pseudomonas* sp. I1.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo General:

- 3.1.1. Identificar el mecanismo de evolución de la piocina S14 de *Pseudomonas* sp. I1 dentro del subgrupo *Pseudomonas koreensis* mediante reconstrucciones filogenéticas y comparación de módulos funcionales.

3.2. Objetivos específicos:

- 3.2.1. Reconstrucción filogenética de cepas de *Pseudomonas* pertenecientes al subgrupo *P. koreensis*.
- 3.2.2. Identificación y comparación filogenética y de motivos funcionales de piocinas ortólogos a piocina S14 presentes en los genomas de las cepas del subgrupo *P. koreensis*.

3.3. Hipótesis:

- 3.3.1. De manera similar al mecanismo de evolución de las colicinas con actividad DNasa, la piocina S14 y sus ortólogos en bacterias del subgrupo *P. koreensis* comparten un ancestro común y no evolucionan por recombinación de dominios con otras piocinas.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. Reconstrucción filogenética de cepas de *Pseudomonas* pertenecientes al subgrupo *P. koreensis*.

Para realizar la reconstrucción filogenética de cepas de *Pseudomonas* pertenecientes al subgrupo *P. koreensis* se seleccionó un subgrupo de cepas representativas de este subgrupo desde un árbol filogenético del complejo de *Pseudomonas fluorescens* reportadas en un estudio previo (24) (Tabla N°1).

Nombre de la cepa	ID del genoma
<i>Pseudomonas</i> sp. GM25	1144327.3
<i>Pseudomonas moraviensis</i> strain TYU6	321662.8
<i>Pseudomonas fluorescens</i> R124	743713.3
<i>Pseudomonas koreensis</i> strain DSM 16610	198620.87
<i>Pseudomonas fluorescens</i> strain 48D1	294.472
<i>Pseudomonas baetica</i> strain a390	674054.7
<i>Pseudomonas fluorescens</i> NZ011	564420.7
<i>Pseudomonas</i> sp. GM16	1144322.3
<i>Pseudomonas</i> sp. GM24	1144326.3

Tabla 1. Tabla con nombres de cepas utilizadas como muestras representativas para la reconstrucción de la filogenia del subgrupo *P. koreensis* y su número identificador del genoma en la plataforma PATRIC.

Los genomas de estas cepas se obtuvieron y agruparon desde la plataforma PATRIC (Pathosystems Resource Integration Center)(26). Posteriormente utilizando el servicio genómico “phylogenetic tree” desde PATRIC se reconstruyó un árbol filogenético preliminar de las cepas con base en 20 proteínas conservadas entre todas las especies. De este análisis se recuperó el alineamiento de la secuencia concatenada de las proteínas en formato Newick (.nwk). Posteriormente este alineamiento se utilizó para reconstruir la filogenia de las cepas muestra utilizando el programa MEGA X mediante el método de Máxima Verosimilitud (MV) y el modelo de sustitución de aminoácidos Le Gascuel (LG), incluyendo un test de bootstrap con 500 replicaciones. Se incluyó como *outgroup* la cepa *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 para enraizar el árbol filogenético.

4.2. Identificación y comparación filogenética y de motivos funcionales de piocinas presentes en los genomas de las cepas del subgrupo *P. koreensis*.

4.2.1. Identificación de piocinas presentes en los genomas de las cepas del subgrupo *P. koreensis*.

Para la identificación de piocinas presentes en los genomas de las cepas del subgrupo *P. koreensis* inicialmente se utilizó la plataforma PATRIC para obtener las secuencias genómicas en formato FASTA de cada una de las cepas de interés. Posteriormente,

estos genomas se analizaron mediante la plataforma BAGEL4 para identificar genes que codifican para bacteriocinas. Posteriormente, se construyó utilizando el programa BioEdit una base de datos de proteínas con las bacteriocinas encontradas en estos genomas mediante BAGEL4 agrupadas por especie.

4.2.2. Reconstrucción filogenética de piocinas presentes en cepas del subgrupo *P. koreensis*.

Con las secuencias de piocinas obtenidas en el paso anterior, se realizó la reconstrucción filogenética de las piocinas presentes en los genomas de las cepas del grupo de *P. koreensis* utilizando MEGA X mediante el método de MV y el modelo de sustitución de aminoácidos LG, con un test de bootstrap con 500 replicaciones. En éste análisis también se incluyó como *outgroup* una bacteriocina de la cepa de *Pseudomonas* sp. JR-1, la cual no pertenece al subgrupo *P. koreensis*, para enraizar el árbol filogenético. Mediante este árbol se identificaron las piocinas agrupadas con la piocina S14 y por lo tanto las especies que conservan un ortólogo de esta piocina.

4.2.3. Identificación de dominios funcionales de ortólogos de la piocina S14 presentes en los genomas de las cepas del subgrupo *P. koreensis*

Para la identificación de los dominios funcionales de las piocinas se utilizaron las herramientas BioEdit y Jalview. La identificación de los dominios se realizó mediante búsquedas BLAST y alineamientos específicos contra la base de datos de las piocinas codificadas por las cepas del subgrupo *P. koreensis* y también contra una base de datos de bacteriocinas tipo colicinas identificadas y caracterizadas previamente (13).

4.2.4. Identificación del origen filogenético de los dominios funcionales de las piocinas en los genomas de las cepas del subgrupo *P. koreensis* por similitud con otras piocinas

La identificación del origen filogenético se realizó realizando un BLAST para cada uno de los dominios funcionales de las piocinas del subgrupo contra las secuencias proteicas de todas las piocinas encontradas en los genomas de las cepas y también contra las piocinas caracterizadas experimentalmente. Se utilizó el programa BioEdit con el objetivo de generar una base de datos que permitiera comparar los diferentes dominios por separado, lo anterior mediante archivos en formato .fas que contenían las secuencias de los dominios para cada una de las piocinas del subgrupo *P. koreensis* agrupadas con la piocina S14. La identificación filogenética por similitud de alineamientos se realizó utilizando una base de datos propia hecha con las bacteriocinas identificadas en las cepas muestra seleccionadas desde el subgrupo *P. koreensis*, y la base de datos previa con bacteriocinas externas (13)

4.2.5. Comparación de la identidad en los dominios funcionales de piocinas presentes en los genomas de las cepas del subgrupo *P. koreensis*

Para la comparación de los dominios funcionales se utilizó la base de datos en archivos .fas creada anteriormente que contenían las secuencias de los dominios para cada una de las piocinas del subgrupo *P. koreensis* agrupadas con la piocina S14. Con estas secuencias se realizó un alineamiento múltiple mediante la herramienta MUSCLE del EMBL-EBI (27), para obtener una matriz de identidad porcentual para cada dominio (Anexo, Tabla N°2). Con los resultados de esta matriz se calculó la identidad promedio para los diferentes dominios de las piocinas y para el segmento amino-terminal no estructurado de las piocinas.

	Dominio killer	1:	2:	3:	4:	5:	6:	7:	Promedio
1:	NZ011-Carocin-D-DK	100	79,63	64,81	64,2	60,49	55,62	55,62	60,694
2:	I1-Piocina-S14-DK	79,63	100	67,28	69,75	54,32	53,75	53,75	
3:	a390-Carocin-D-DK	64,81	67,28	100	74,69	53,09	54,38	54,38	
4:	DSM16610-Carocin-D-DK	64,2	69,75	74,69	100	50,62	55	55	
5:	GM25-Carocin-D-DK	60,49	54,32	53,09	50,62	100	68,75	68,75	
6:	GM24-Carocin-D-DK	55,62	53,75	54,38	55	68,75	100	100	
7:	GM16-Carocin-D-DK	55,62	53,75	54,38	55	68,75	100	100	
	Dominio translocación	1:	2:	3:	4:	5:	6:	7:	Promedio
1:	GM25-Carocin-D-DT	100	38,25	36,99	37,44	36,99	36,99	38,36	62,9945
2:	DSM16610-Carocin-D-DT	38,25	100	55,96	57,8	57,8	57,8	56,88	
3:	a390-Carocin-D-DT	36,99	55,96	100	84,09	80,91	80,91	80,45	
4:	NZ011-Carocin-D-DT	37,44	57,8	84,09	100	85	85	84,09	
5:	GM24-Carocin-D-DT	36,99	57,8	80,91	85	100	100	84,09	
6:	GM16-Carocin-D-DT	36,99	57,8	80,91	85	100	100	84,09	
7:	I1-Piocina-S14-DT	38,36	56,88	80,45	84,09	84,09	84,09	100	
	Dominio reconocimiento	1:	2:	3:	4:	5:	6:	7:	Promedio
1:	DSM16610-Carocin-D-DR	100	40,61	16,67	40,93	38,01	37,27	37,27	52,9945
2:	GM25-Carocin-D-DR	40,61	100	47,83	48,31	53,37	50	50	
3:	NZ011-Carocin-D-DR	16,67	47,83	100	51,11	56,86	71,43	71,43	
4:	I1-Piocina-S14-DR	40,93	48,31	51,11	100	69,05	70,04	70,04	
5:	a390-Carocin-D-DR	38,01	53,37	56,86	69,05	100	69,53	69,53	
6:	GM24-Carocin-D-DR	37,27	50	71,43	70,04	69,53	100	100	
7:	GM16-Carocin-D-DR	37,27	50	71,43	70,04	69,53	100	100	
	Zona hipervariable	1:	2:	3:	4:	5:	6:	7:	Promedio
1:	GM25-Carocin-D-ZHV	100	50	33,33	50	50	48,48	45,95	49,508
2:	DSM16610-Carocin-D-ZHV	50	100	29,17	32,61	32,61	35,19	37,93	
3:	I1-Piocina-S14-ZHV	33,33	29,17	100	61,64	61,64	51,11	57,89	
4:	GM24-Carocin-ZHV	50	32,61	61,64	100	100	68,18	59,76	
5:	GM16-Carocin-ZHV	50	32,61	61,64	100	100	68,18	59,76	
6:	NZ011-Carocin-D-ZHV	48,48	35,19	51,11	68,18	68,18	100	56,73	
7:	a390-Carocin-D-ZHV	45,95	37,93	57,89	59,76	59,76	56,73	100	
	No estructurado	1:	2:	3:	4:	5:	6:	Promedio	
1:	DSM16610-Carocin-D-NE	100	32,43	32,88	32,88	30,77	26,56	44,71857143	
2:	GM25-Carocin-D-NE	32,43	100	22,22	22,22	33,33	33,33		
3:	GM24-Carocin-D-NE	32,88	22,22	100	100	68,18	72,31		
4:	GM16-Carocin-D-NE	32,88	22,22	100	100	68,18	72,31		
5:	a390-Carocin-D-NE	30,77	33,33	68,18	68,18	100	78,46		
6:	I1-piocina-S14-NE	26,56	33,33	72,31	72,31	78,46	100		

Tabla 2. Matriz porcentual de identidad. Se indican los valores en porcentaje de la identidad de los diferentes dominios para cada piocina y el promedio de estos por cada dominio (Dominio killer: DK, Dominio de translocación: DT y Dominio de reconocimiento: DR), el promedio se calculó sin considerar la identidad que las secuencias tenían consigo mismas. De igual manera se indica el porcentaje de identidad para la zona hipervariable y el segmento no estructurado de las proteínas. No se consideró la secuencia de la carocina D de la cepa NZ011 en el segmento no estructurado debido a que esta no posee aquel segmento. De igual manera no se consideró la secuencia de 48D1-Carocin-D debido a que sólo posee un fragmento del dominio killer.

4.2.6. Identificación de regiones *Coiled coil* presentes en las piocinas del subgrupo *P. koreensis* agrupadas junto a la piocina S14

Para la identificación de *Coiled coils* desde las secuencias de aminoácidos de las piocinas del subgrupo *P. koreensis* agrupadas junto a la piocina S14 se utilizó la plataforma Waggawagga *Coiled coil* prediction (28) usando las herramientas Marcoil, Multicoil 2, Ncoils y Paircoil 2. Los datos obtenidos desde la identificación de *Coiled Coils* fueron contrastados posteriormente con los resultados obtenidos desde la matriz de identidad porcentual.

5. RESULTADOS

5.1. Identificación de bacteriocinas presentes en los genomas de las cepas del subgrupo *P. koreensis*.

Se identificaron desde BAGEL4 un total 26 bacteriocinas (Anexo, Tabla N°3), en los genomas de nueve de las diez cepas analizadas del subgrupo *P. koreensis*. No se encontraron bacteriocinas en el genoma de *Pseudomonas moraviensis* strain TYU6, lo que podría indicar una posible pérdida de aquellos genes en esta cepa. Las bacteriocinas fueron clasificadas por BAGEL4 como Carocinas D, Colicinas, Colicinas tipo E y Colicinas tipo M por su identidad de dominios con estos tipos de bacteriocinas. Pero al ser todas cepas de *Pseudomonas spp.*, lo correcto es referirnos a ellas como bacteriocinas o piocinas, por la misma razón, la piocina S14 fue denominada como Carocina D por BAGEL4. Algunas bacteriocinas identificadas presentaban una secuencia de aminoácidos reducida de manera considerable, lo que podría indicar deleciones de dominios.

Identificación de piocinas presentes en los genomas de las cepas del subgrupo <i>P. koreensis</i> .	
Nombre de la cepa	Bacteriocinas identificadas por BAGEL4
<i>Pseudomonas</i> sp. GM25	GM25-Carocin-D
	GM25-Colicin-E6
	GM25-Colicin
<i>Pseudomonas fluorescens</i> R124	R124-Colicin-E6
	R124-Colicin-E9
<i>Pseudomonas koreensis</i> strain DSM 16610	DSM16610-Carocin-D
	DSM16610-Colicin
	DSM16610-Colicin-M
	DSM16610-Colicin-M2
<i>Pseudomonas fluorescens</i> strain 48D1	48D1-Carocin-D
	48D1-Colicin
<i>Pseudomonas baetica</i> strain a390	a390-Carocin-D
	a390-Colicin-E9
	a390-Colicin-E9-2
	a390-Colicin
	a390-Colicin-2
	a390-Colicin-3
<i>Pseudomonas fluorescens</i> NZ011	NZ011-Carocin-D
	NZ011-Colicin-M
<i>Pseudomonas</i> sp. GM24	GM24-Carocin-D
	GM24-Colicin-E6
<i>Pseudomonas</i> sp. GM16	GM16-Colicin-E6
	GM16-Carocin-D
<i>Pseudomonas</i> sp. I1	I1-Piocina-S14
	I1-Colicin
	I1-Colicin-E9
<i>Pseudomonas moraviensis</i> strain TYU6	No se encontraron bacteriocinas

Tabla 3. Identificación de piocinas presentes en los genomas de las cepas del subgrupo *P. koreensis*.

5.2. Reconstrucción filogenética de piocinas presentes en subgrupo *P. koreensis*.

Con las secuencias de aminoácidos obtenidas desde la identificación de bacteriocinas se realizó la reconstrucción filogenética de las bacteriocinas presentes en el subgrupo *P. koreensis*. Esta filogenia muestra una marcada división de las bacteriocinas en dos clados principales, un clado de carocinas D, ortólogas a la piocina S14 y un clado de bacteriocinas denominadas como colicinas por BAGEL4. Como resultado se encontraron ortólogos de la piocina S14 en siete de las cepas estudiadas (Figura 2).

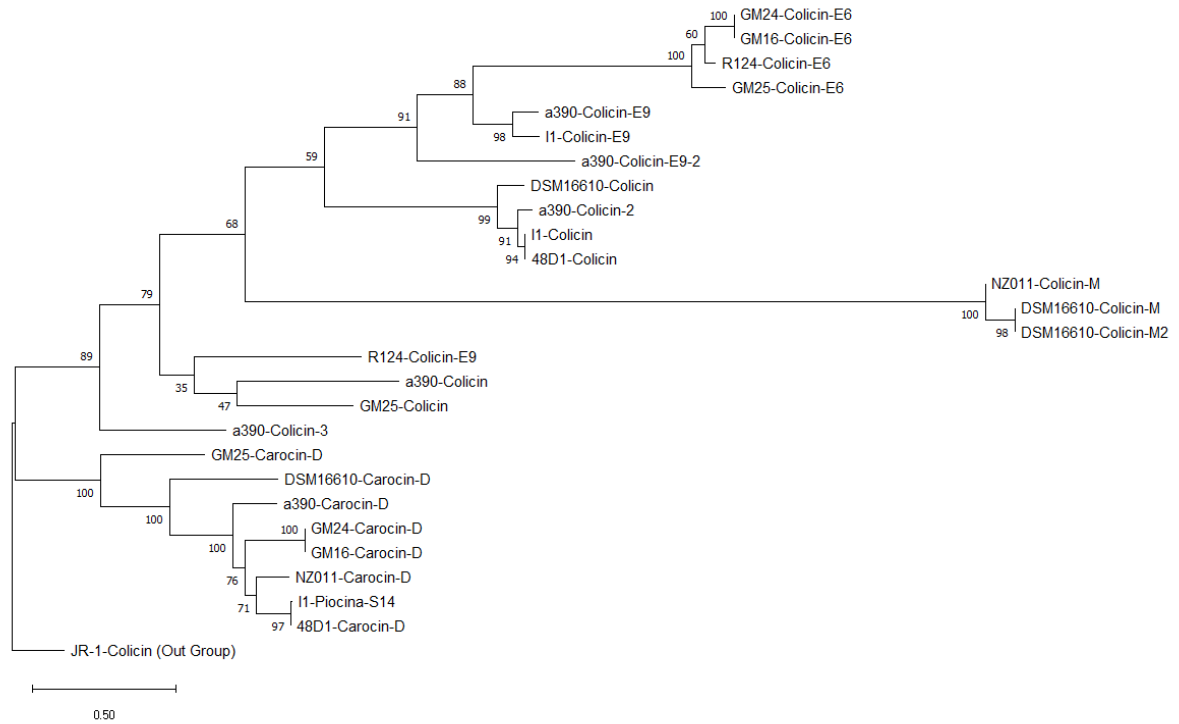


Figura 2. Filogenia de las bacteriocinas presentes en las cepas del subgrupo *P. koreensis*. Filogenia construida a partir de secuencias de aminoácidos. Las cifras a la izquierda de cada nodo representan el valor de bootstrap. Fueron identificadas un total 26 bacteriocinas en los genomas de nueve de las diez cepas analizadas del subgrupo *P. koreensis*. Correspondiendo para *Pseudomonas* sp. GM25: **GM25-Carocin-D**, GM25-Colicin-E6 y GM25-Colicin, para *Pseudomonas fluorescens* R124: R124-Colicin-E6 y R124-Colicin-E9, para *Pseudomonas koreensis* strain DSM 16610: **DSM16610-Carocin-D**, DSM16610-Colicin, DSM16610-Colicin-M y DSM16610-Colicin-M2, para *Pseudomonas fluorescens* strain 48D1: **48D1-Carocin-D** y 48D1-Colicin, para *Pseudomonas baetica* strain a390: **a390-Carocin-D**, a390-Colicin-E9, a390-Colicin-E9-2, a390-Colicin, a390-Colicin-2 y a390-Colicin-3, para *Pseudomonas fluorescens* NZ011: **NZ011-Carocin-D** y NZ011-Colicin-M, para *Pseudomonas* sp. GM24: **GM24-Carocin-D** y GM24-Colicin-E6, para *Pseudomonas* sp. GM16: **GM16-Carocin-D** y GM16-Colicin-E6, para *Pseudomonas* sp. I1: **I1-Piocina-S14**, I1-Colicin e I1-Colicin-E9, y para *Pseudomonas moraviensis* strain TYU6 no se encontraron bacteriocinas. De las anteriores, las siete bacteriocinas caracterizadas como “Carocin-D” corresponden a ortólogos de la piocina S14. No se encontraron ortólogos de la piocina S14 en *Pseudomonas fluorescens* R124 ni en *Pseudomonas moraviensis* strain TYU6.

5.3. Identificación de dominios funcionales de piocinas presentes en los genomas de las cepas del subgrupo *P. koreensis*

Se logró identificar los diferentes dominios de los ortólogos de piocina S14 mediante BLAST y el uso de alineamientos específicos de estas piocinas observando el grado de conservación en la secuencia del alineamiento, esto se realizó utilizando como parámetro para la definición de los límites los dominios previamente delineados para la piocina S14 en un estudio previo(13). Este análisis arrojó que la región con menor conservación es el segmento amino-terminal no estructurado. Respecto a los dominios funcionales se puede observar que de estos la menor conservación se observa en el dominio de reconocimiento del receptor, el cual posee un segmento donde la conservación es significativamente más baja, presentando incluso inserciones y deleciones de secuencia (Figura 3). Este segmento fue denominado como zona hipervariable y podría dar luces sobre la diversa especificidad de estas piocinas debido a que se encuentra en el dominio de reconocimiento de las piocinas.

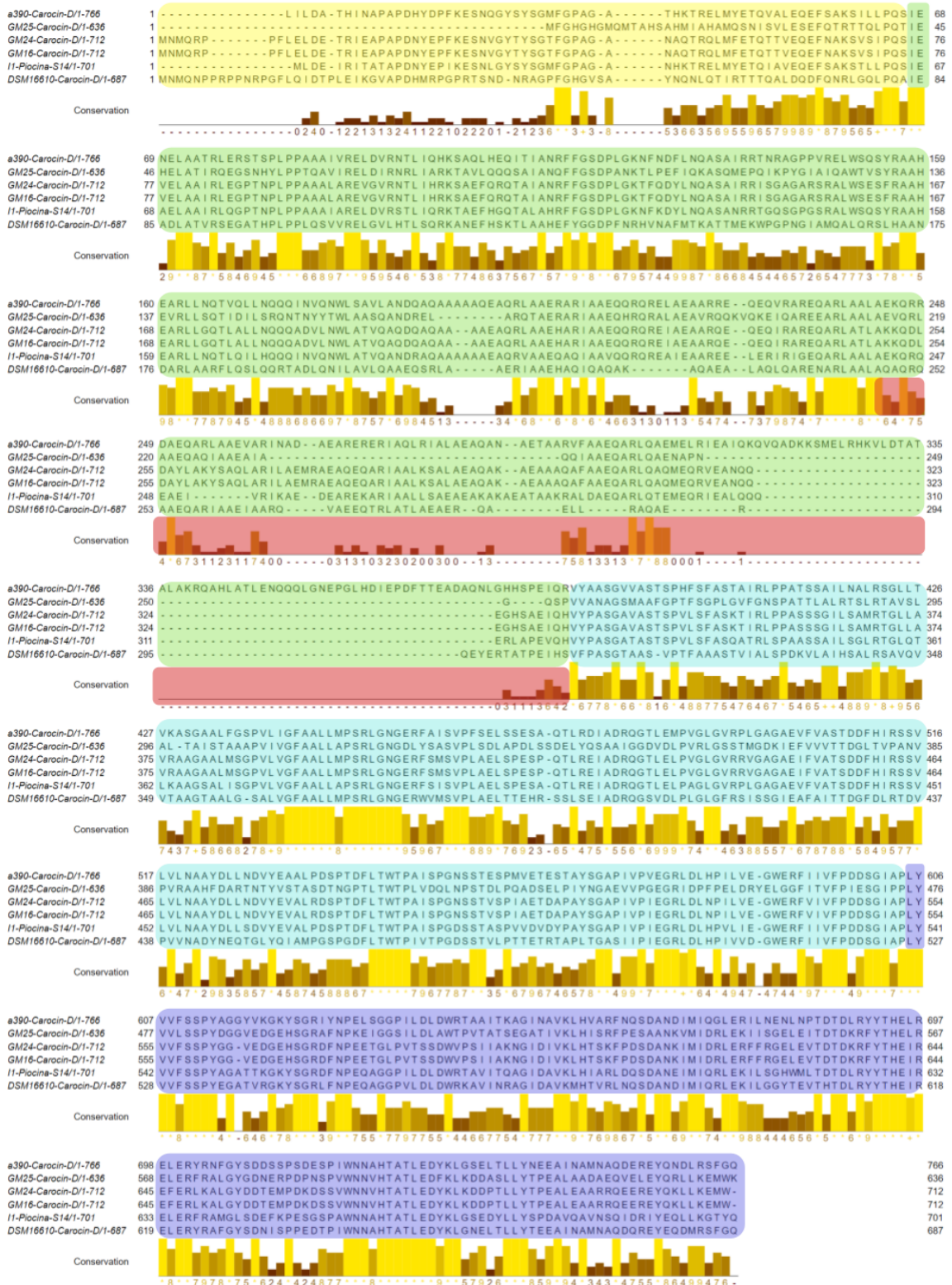


Figura 3. Identificación de dominios funcionales mediante el alineamiento de los ortólogos de la piocina S14.

En la figura se define con un código de color la secuencia de aminoácidos correspondiente a cada dominio (Amarillo: segmento no estructurado, Verde: Dominio de reconocimiento de receptor, Celeste: Dominio de translocación y Violeta:

Dominio killer). En rojo se indica el segmento de baja conservación denominado como zona hipervariable. No se muestran las piocinas trucas NZ011-Carocin-D y 48D1-Carocin-D en esta figura debido a que disminuirían la conservación de forma artificial en los extensos segmentos que no poseen, dificultando la interpretación de la conservación.

5.4. Reconstrucción filogenética de cepas de *Pseudomonas* pertenecientes al subgrupo *P. koreensis*.

Fueron utilizadas las secuencias del concatenado de 20 proteínas conservadas de las cepas del subgrupo *P. koreensis* para reconstruir su filogenia. Se incluyó como *outgroup* la cepa *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 para enraizar el árbol filogenético. Se puede observar en este árbol filogenético que *Pseudomonas* sp. I1 se relaciona estrechamente con *P. fluorescens* 48D1 dentro del mismo clado que *P. moraviensis* strain TYU6, *P. fluorescens* R124 y *P. koreensis* strain DSM 16610. La anotación de la presencia de los ortólogos de la piocina S14 permite observar que dentro del subgrupo *P. koreensis* ocurrió una pérdida del ortólogo en el ancestro del cluster de las cepas TYU6 y R124, que no poseen piocinas ortólogas de la piocina S14. Esta anotación también indica que *P. fluorescens* 48D1, perdió la mayoría de la secuencia de la piocina S14, conservando sólo una parte del dominio killer de la piocina S14 (Figura 4).

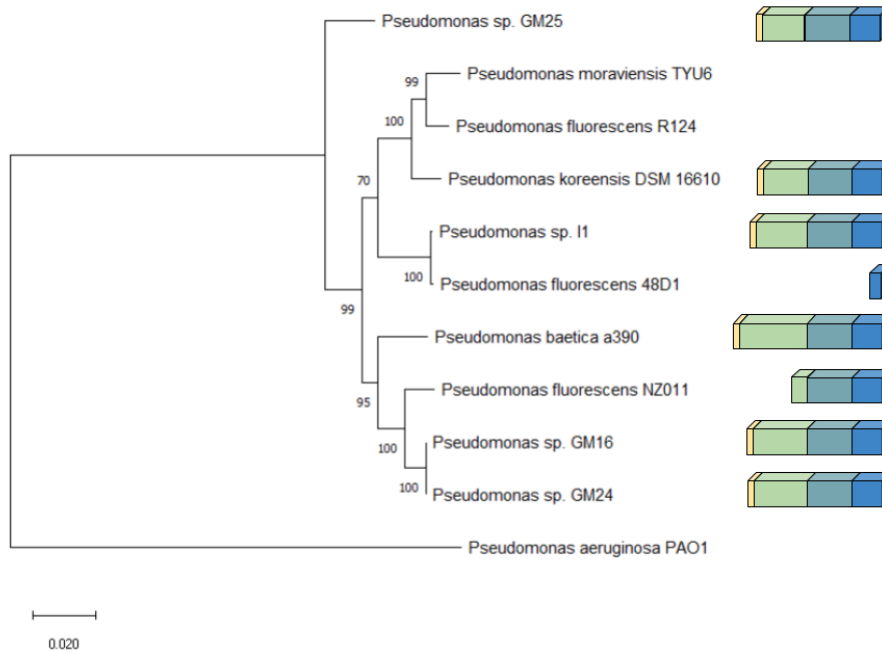


Figura 4. Filogenia de las especies del subgrupo *P. koreensis*. Filogenia construida a partir de las secuencias de aminoácidos del concatenado de 20 proteínas conservadas del subgrupo *P. koreensis*. Las cifras a la izquierda de cada nodo representan el valor de bootstrap. Se observa a la derecha la ilustración esquemática por color de dominios de acuerdo a la figura 1 de las piocinas ortólogas de S14.

5.5. Identificación filogenética por similitud de alineamientos para los dominios funcionales de piocinas en los genomas de las cepas del subgrupo *P. koreensis*

Los BLAST realizados a los diferentes dominios de las piocinas utilizando como base de datos un archivo más amplio con bacteriocinas fuera del subgrupo *P. koreensis* presentaron en todas las ocasiones mayor identidad con las bacteriocinas pertenecientes a cepas del subgrupo *P. koreensis*, lo que da indicios de que su mecanismo evolutivo no es la formación de mosaicos modulares como las colicinas formadoras de poros, sino que pareciera ser un proceso de evolución proveniente de un ancestro común de estas cepas de *Pseudomonas*, similar a lo reportado para otras colicinas con actividad nucleasa.

5.6. Comparación de la identidad en los dominios funcionales de piocinas presentes en los genomas de las cepas del subgrupo *P. koreensis*.

Utilizando la matriz de identidad porcentual (Tabla N°2) se calculó la identidad promedio entre los dominios de las piocinas pertenecientes al subgrupo *P. koreensis*. Los dominios DNAsa presentaron una identidad promedio del 60,69%, los dominios de translocación presentaron una identidad promedio de 62,99%, los dominios de reconocimiento presentaron un menor porcentaje correspondiente a 52,96% de identidad promedio, las regiones no estructuradas presentaron un 44,75% de identidad promedio y la zona hipervariable presentó un 49,5% de identidad promedio (Figura 5).

5.7. Identificación de *Coiled Coils* presentes en las piocinas del subgrupo *P. koreensis* agrupadas junto a la piocina S14

Utilizando la herramienta Marcoil se realizó para todas las piocinas del subgrupo *P. koreensis* ortólogas de la piocina S14 una predicción de formación de estructuras *Coiled coils*. Los resultados indican la probable formación de estructuras *Coiled coil* para todas las piocinas S14 completas, y en todos los casos estas regiones se localizan dentro del segmento denominado como zona hipervariable antes descrito (Anexo, Tabla N°4) (Figura 5). Esto es un resultado interesante debido a que la formación de estas estructuras se relaciona con la capacidad de las proteínas de interactuar con otras proteínas (34) y una gran variabilidad en este segmento de la proteína puede actuar como un factor que aumente variabilidad en las especificidades de las piocinas.

Identificación de Coiled Coils presentes en las piocinas del subgrupo <i>P. koreensis</i> agrupadas junto a la piocina S14		
Nombre de la cepa	Piocina	Pocición en la secuencia de aminoácidos
<i>Pseudomonas</i> sp. GM25	GM25-Carocin-D	171-242
<i>Pseudomonas koreensis</i> strain DSM 16610	DSM16610-Carocin-D	187 - 223
<i>Pseudomonas baetica</i> strain a390	A390-Carocin-D	191 - 349
<i>Pseudomonas</i> sp. I1	Piocina S14	165 - 311
<i>Pseudomonas</i> sp. GM16	GM16-Carocin-D	202 - 316
<i>Pseudomonas</i> sp. GM24	GM24-Carocin-D	202 - 316

Tabla 4. Identificación de *Coiled coils* presentes en las piocinas del subgrupo *P. koreensis* agrupadas junto a la piocina S14. Las predicciones se registraron según los datos entregados por la herramienta Marcoil

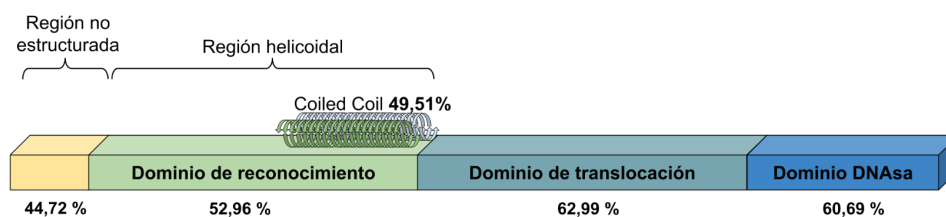


Figura 5. Esquema de dominios y regiones con el porcentaje de identidad promedio de cada dominio. En la figura se indica el porcentaje de variabilidad que presentan las piocinas del subgrupo *P. koreensis* en cada uno de sus dominios. El esquema de loops sobre la figura indica la zona hipervariable donde se forman las *Coiled coils*.

6. DISCUSIÓN

Algunas de las bacteriocinas identificadas mediante BAGEL4 resultaron tener un menor tamaño de lo esperado, en el caso de la *P. fluorescens* 48D1, su porción de piocina es solo de 97 aminoácidos, correspondiente a un fragmento del dominio killer. Su identidad con la secuencia correspondiente a la piocina S14 es del 99% y su similitud es del 100%. Este tipo de resultados dificultó el análisis de la información, ejemplo de esto es la diferencia que se puede apreciar entre la filogenia de las especies para la cepa *P. fluorescens* 48D1 y la filogenia de las piocinas identificadas como carocina D, ortólogas de la piocina S14. Sin embargo, aquello habla de la dinámica adaptación de las bacteriocinas a su medio. Cabe la posibilidad que la cepa 48D1 se haya desarrollado en un medio donde las especies competidoras no portaban receptores para la piocina S14

de esta cepa y por lo tanto se perdió esta bacteriocina completa o parcialmente con el paso de las generaciones. Paralelamente se pudo haber logrado adaptar por presión selectiva otra bacteriocina funcional en el genoma de la *P. fluorescens* 48D1, la cual podría ser la bacteriocina identificada como 48D1-Colicin, que presenta una secuencia completa en este genoma según el análisis de BAGEL4.

De manera interesante, en el alineamiento realizado para identificar los dominios de los ortólogos de la piocinas S14 se pueden identificar dos regiones de la piocina que están variando más rápidamente que el resto de la secuencia. Esto ocurre con el segmento no estructurado y con el dominio de reconocimiento. La disminución de la conservación en el segmento no estructurado probablemente se puede explicar por la baja presión selectiva que existe sobre los aminoácidos en este segmento no estructurado. Los segmentos que generan estructuras secundarias como láminas beta o hélices alfa pueden perder su conformación de cambiar un aminoácido y perder la actividad de la proteína (32), por lo tanto la presión selectiva negativa sobre estos aminoácidos es mayor. En cambio si el segmento es no estructurado puede incorporar más fácilmente cambios en los aminoácidos sin que afecte la disposición en el espacio y la funcionalidad de la proteína, transmitiendo así fácilmente los diferentes cambios en estos aminoácidos a la siguiente generación. En el caso de la disminución de la conservación en el dominio de reconocimiento, una hipótesis es que la competencia por hierro ejerce presión para la modificación de este dominio. Los principales receptores de las piocinas de tipo S son las proteínas receptoras de ferropioverdinas, las cuales también están siendo modificadas constantemente para adaptarse a la competencia por el hierro en el ambiente (30, 31, 32). Por lo tanto, los dominios de reconocimiento de receptores experimentan mutaciones recíprocas para reconocerlos. Otra explicación es que la especificidad de las piocinas que radica en su dominio de reconocimiento sea definida por el tipo de bacterias competidoras presentes en los nichos específicos de cada especie portadora de la piocina. Esta presión selectiva aumentaría la variabilidad del dominio de reconocimiento

entre cepas de diferentes ambientes, concordando con lo observado por Gorter (22) y Mojesky (23).

En los BLAST realizados en la identificación filogenética por similitud de alineamientos para los diferentes dominios funcionales, las piocinas de las cepas del subgrupo *P. koreensis* mantienen en todos sus dominios una mayor identidad y similitud con las piocinas ortólogas de S14 dentro del subgrupo y no así con bacteriocinas fuera de este grupo. Lo anterior es indicativo de que no hay una modularidad en mosaico en los dominios de estas piocinas. De presentar modularidad en mosaico se esperaría observar para los resultados de los BLAST niveles de identidad variados entre los mismos dominios de diferentes piocinas, unos altamente compartidos y otros divergentes con mejores hits con piocinas diferentes a los ortólogos de S14, pero aquello no ocurre. Con base en esto se puede descartar para estas piocinas el modelo de evolución por recombinación modular reportado para las colicinas formadoras de poros. Similar a lo descrito para las colicinas con actividad DNAsa (20), estas piocinas presentan porcentajes de identidades similares entre sus dominios, oscilando alrededor del 40% y 60%, según lo observado en los BLAST y en la matriz de identidad. Además filogenéticamente se organizan de manera similar a como se organizan las cepas desde donde fueron identificadas. Esto sugiere que las piocinas ortólogas de S14 poseen un ancestro común el cual evoluciona variando paulatinamente sus dominios, en particular, el dominio de reconocimiento según lo observado en el análisis de conservación y en la matriz de identidad. La predicción de estructuras de tipo *Coiled coil*, situadas dentro del segmento denominado como zona hipervariable, el cual está dentro del dominio de reconocimiento de las piocinas, sugiere que la especificidad de las piocinas ortólogas de S14 es dependiente de la variabilidad de esta zona, pues, en colicinas las estructuras de tipo *Coiled coil* se relacionan con la interacción entre proteínas (13, 34). Esto podría ser estudiado posteriormente de forma experimental purificando las piocinas ortólogas de

S14 producidas por diferentes cepas y realizando ensayos de inhibición contra diferentes cepas para obtener evidencia más contundente de esta relación.

7. CONCLUSIÓN

La comparación de la identidad en los dominios funcionales de las piocinas presentes en los genomas de las cepas del subgrupo *P. koreensis*, apunta a que los dominios de las diferentes piocinas ortólogas de S14 no recombinan módulos, sino que evolucionan de forma similar a como lo hacen las colicinas con actividad DNAsa. Los ortólogos de la piocina S14 mantienen altos porcentajes de identidad en dominios más conservados como el dominio killer y varían más rápidamente en su dominio de reconocimiento, mediante sustitución de aminoácidos, deleciones o inserciones en la secuencia de este dominio. Estos cambios probablemente se relacionan con la afinidad de las piocinas por sus diferentes receptores al ser cambios que probablemente afectan la conformación espacial del dominio de unión a receptor. Además, la organización similar que se puede observar en la reconstrucción filogenética de las cepas del subgrupo *P. koreensis* comparada a la reconstrucción filogenética de las piocinas ortólogas de S14 del subgrupo *P. koreensis* entrega evidencia que apoya la hipótesis de un proceso evolutivo ligado a la existencia de un ancestro común para las piocinas ortólogas de S14. Finalizando, esta investigación entrega información importante sobre la dinámica macromolecular resultante de la evolución de este tipo de piocina, evidenciando también las zonas de mayor y menor conservación en los dominios de las diferentes piocinas ortólogas de S14. Esto puede ayudar a comprender dónde y cómo enfocar posteriores investigaciones en pro de obtener nuevos recursos para el control de enfermedades causadas por patógenos basados en el uso de piocinas.

8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Laxminarayan, R., Matsoso, P., Pant, S., Brower, C., Rottingen, J. A., Klugman, K., & Davies, S. (2016). Access to effective antimicrobials: a worldwide challenge. *The Lancet*, 387(10014), 168-175.
[https://www.thelancet.com/journals/lancet/article/PIIS0140-6736\(15\)00474-2/fulltext](https://www.thelancet.com/journals/lancet/article/PIIS0140-6736(15)00474-2/fulltext)
2. World Health Organization. (2017). Global antimicrobial resistance surveillance system (GLASS) report: early implementation 2016-2017. Pag 3.
[https://www.who.int/docs/default-source/searo/amr/global-antimicrobial-resistance-surveillance-system-\(glass\)-report-early-implementation-2016-2017.pdf?sfvrsn=ea19cc4a_2](https://www.who.int/docs/default-source/searo/amr/global-antimicrobial-resistance-surveillance-system-(glass)-report-early-implementation-2016-2017.pdf?sfvrsn=ea19cc4a_2)
3. Nathan, C., & Cars, O. (2014). Antibiotic resistance—problems, progress, and prospects. *New England Journal of Medicine*, 371(19), 1761-1763.
https://www.nejm.org/doi/10.1056/NEJMp1408040?url_ver=Z39.88-2003&rfr_id=ori:rid:crössref.org&rfr_dat=cr_pub%20%200www.ncbi.nlm.nih.gov
4. Torres, A. H., Vázquez, E. G., Martínez, J. H., & Gómez, J. G. (2014). Infecciones por bacilos gramnegativos no fermentadores: *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter* sp. Y *Stenotrophomonas maltophilia*. *Medicine-Programa de Formación Médica Continuada Acreditado*, 11(56), 3311-3316.
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0304541214707759?via%3Dihub>
5. Paz-Zarza, V. M., Mangwani-Mordani, S., Martínez-Maldonado, A., Álvarez-Hernández, D., Solano-Gálvez, S. G., & Vázquez-López, R. (2019). *Pseudomonas aeruginosa*: patogenicidad y resistencia antimicrobiana en la infección urinaria. *Revista chilena de infectología*, 36(2), 180-189.
https://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0716-10182019000200180
6. Strateva, T., & Yordanov, D. (2009). *Pseudomonas aeruginosa*—a phenomenon of bacterial resistance. *Journal of medical microbiology*, 58(9), 1133-1148.
<https://www.microbiologyresearch.org/content/journal/jmm/10.1099/jmm.0.009142-0#tab2>
7. Otaíza, F., Orsini, M., Pohlenz, M., & Tarride, T. (2017). Informe de Vigilancia de Infecciones Asociadas a la Atención en Salud. Ministerio de Salud, Departamento de

Calidad y Formación Control de IAAS; Minsal: Santiago, Chile, pag 15-43.

<https://www.minsal.cl/wp-content/uploads/2015/09/informe-vigilancia-2017.pdf>

8. Gaete, M. E., Valenzuela, M. P., Bachero, A. W., Vega, C. C., Marín, N. V., Labarca, J. L., & Cañete, P. G. (2020). Carbapenemasas en *Pseudomonas aeruginosa* con susceptibilidad disminuida a los carbapenémicos después de una década, desde VIM a KPC. *Revista chilena de infectología*, 37(4), 389-394.
https://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0716-10182020000400389&lang=pt#B2
9. Acuña, M. P., Cifuentes, M., Silva, F., Rojas, Á., Cerda, J., & Labarca, J. (2017). Incidencia de bacterias multi-resistentes en unidades de cuidados intensivos de hospitales chilenos. *Revista chilena de infectología*, 34(6), 570-575.
<https://scielo.conicyt.cl/pdf/rci/v34n6/0716-1018-rci-34-06-0570.pdf>
10. Llanes, C., Köhler, T., Patry, I., Dehecq, B., Van Delden, C., & Plésiat, P. (2011). Role of the MexEF-OprN efflux system in low-level resistance of *Pseudomonas aeruginosa* to ciprofloxacin. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 55(12), 5676-5684.
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21911574/>
11. Breidenstein, E. B., de la Fuente-Núñez, C., & Hancock, R. E. (2011). *Pseudomonas aeruginosa*: all roads lead to resistance. *Trends in microbiology*, 19(8), 419-426.
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21664819/>
12. Gellatly, S. L., & Hancock, R. E. (2013). *Pseudomonas aeruginosa*: new insights into pathogenesis and host defenses. *Pathogens and disease*, 67(3), 159-173.
<https://academic.oup.com/femspd/article/67/3/159/2398791>
13. Guaya, D. (2021). "Identificación y caracterización de genes para la síntesis de metabolitos especializados y bacteriocinas de *Pseudomonas* sp. I1 involucrados en la capacidad de inhibir el crecimiento de patógenos microbianos". [Tesis de magíster, Universidad de Chile]

14. Meade, E., Slattery, M. A., & Garvey, M. (2020). Bacteriocins, potent antimicrobial peptides and the fight against multi drug resistant species: resistance is futile?. *Antibiotics*, 9(1), 32. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7168330/>
15. Zheng, S., & Sonomoto, K. (2018). Diversified transporters and pathways for bacteriocin secretion in gram-positive bacteria. *Applied microbiology and biotechnology*, 102(10), 4243-4253. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29560521/>
16. Langa, S., Arqués, J. L., Medina, M., & Landete, J. M. (2017). Coproduction of colicin V and lactic acid bacteria bacteriocins in lactococci and enterococci strains of biotechnological interest. *Journal of applied microbiology*, 122(5), 1159-1167. <https://sfamjournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/jam.13439>
17. Simons, A., Alhanout, K., & Duval, R. E. (2020). Bacteriocins, antimicrobial peptides from bacterial origin: overview of their biology and their impact against multidrug-resistant bacteria. *Microorganisms*, 8(5), 639. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7285073/>
18. Sharp, C., Bray, J., Housden, N. G., Maiden, M. C., & Kleanthous, C. (2017). Diversity and distribution of nuclease bacteriocins in bacterial genomes revealed using Hidden Markov Models. *PLoS computational biology*, 13(7), e1005652. <https://journals.plos.org/ploscompbiol/article?id=10.1371/journal.pcbi.1005652>
19. Roh, E., Park, T. H., Kim, M. I., Lee, S., Ryu, S., Oh, C. S., ... & Heu, S. (2010). Characterization of a new bacteriocin, Carocin D, from *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* Pcc21. *Applied and environmental microbiology*, 76(22), 7541-7549. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20870796/>
20. Riley, M. A., & Wertz, J. E. (2002). Bacteriocins: evolution, ecology, and application. *Annual Reviews in Microbiology*, 56(1), 117-137. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12142491/>
21. Michel-Briand, Y., & Baysse, C. (2002). The pyocins of *Pseudomonas aeruginosa*. *Biochimie*, 84(5-6), 499-510. <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0300908402014220>

22. Gorter, F. A., Tabares-Mafla, C., Kassen, R., & Schoustra, S. E. (2021). Experimental evolution of interference competition. *Frontiers in microbiology*, 12, 613450. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8027309/>
23. Mojesky, A. A., & Remold, S. K. (2020). Spatial structure maintains diversity of pyocin inhibition in household *Pseudomonas aeruginosa*. *Proceedings of the Royal Society B*, 287(1938), 20201706. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7735282/>
24. Garrido-Sanz, D., Meier-Kolthoff, J. P., Göker, M., Martín, M., Rivilla, R., & Redondo-Nieto, M. (2016). Genomic and genetic diversity within the *Pseudomonas fluorescens* complex. *PloS one*, 11(2), e0150183. <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0150183>
25. Six, A., Mosbahi, K., Barge, M., Kleanthous, C., Evans, T., & Walker, D. (2021). Pyocin efficacy in a murine model of *Pseudomonas aeruginosa* sepsis. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 76(9), 2317-2324. <https://academic.oup.com/jac/article/76/9/2317/6303575?login=true>
26. Davis JJ, Wattam AR, Aziz RK, Brettin T, Butler R, Butler RM, Chlenski P, Conrad N, Dickerman A, Dietrich EM, Gabbard JL, Gerdes S, Guard A, Kenyon RW, Machi D, Mao C, Murphy-Olson D, Nguyen M, Nordberg EK, Olsen GJ, Olson RD, Overbeek JC, Overbeek R, Parrello B, Pusch GD, Shukla M, Thomas C, VanOeffelen M, Vonstein V, Warren AS, Xia F, Xie D, Yoo H, Stevens R. The PATRIC Bioinformatics Resource Center: expanding data and analysis capabilities. *Nucleic Acids Res.* (2020). Jan 8;48(D1):D606-D612. doi: 10.1093/nar/gkz943. PMID: 31667520. PMCID: PMC7145515. <https://www.patricbrc.org/>
27. Madeira F, Pearce M, Tivey ARN, et al. Search and sequence analysis tools services from EMBL-EBI. (2022). *Nucleic Acids Research*. 2022 Apr;gkac240. DOI: 10.1093/nar/gkac240. PMID: 35412617; PMCID: PMC9252731. <https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/muscle/>
28. Dominic Simm, Klas Hatje, Martin Kollmar, Waggawagga: comparative visualization of coiled-coil predictions and detection of stable single α -helices (SAH domains),

29. Dingemans, J., Ghequire, M. G., Craggs, M., De Mot, R., & Cornelis, P. (2016). Identification and functional analysis of a bacteriocin, pyocin S6, with ribonuclease activity from a *Pseudomonas aeruginosa* cystic fibrosis clinical isolate. *Microbiologyopen*, 5(3), 413-423. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26860427/>
30. Elfarash, A., Dingemans, J., Ye, L., Hassan, A. A., Craggs, M., Reimann, C., ... & Cornelis, P. (2014). Pore-forming pyocin S5 utilizes the FptA ferripyochelin receptor to kill *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology*, 160(2), 261-269. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24217175/>
31. Perraud, Q., Cantero, P., Roche, B., Gasser, V., Normant, V. P., Kuhn, L., ... & Schalk, I. J. (2020). Phenotypic adaptation of *Pseudomonas aeruginosa* by hacking siderophores produced by other microorganisms. *Molecular & Cellular Proteomics*, 19(4), 589-607. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7124469/>
32. Turano, H., Gomes, F., Domingos, R. M., Degenhardt, M. F., Oliveira, C. L., Garratt, R. C., ... & Netto, L. E. (2020). Molecular structure and functional analysis of pyocin S8 from *Pseudomonas aeruginosa* reveals the essential requirement of a glutamate residue in the HNH motif for DNase activity. *Journal of bacteriology*, 202(21), e00346-20. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7549359/>
33. Department of Molecular Genetics, University of Groningen, Nijenborgh 7, 9747 AG Groningen, the Netherlands. (2022). BAGEL4 webserver. <http://bagel4.molgenrug.nl/index.php>
34. Zakharov, S. D., & Cramer, W. A. (2002). Colicin crystal structures: pathways and mechanisms for colicin insertion into membranes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 1565(2), 333-346. [https://doi.org/10.1016/S0005-2736\(02\)00579-5](https://doi.org/10.1016/S0005-2736(02)00579-5)